Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

Durch Immunsuppressiva gesteigerte zelluläre Antikörpersynthese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Wolfgang Flierl
aus
Garmisch-Partenkirchen

1972

D 29

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der

Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. med. G. Koch
Referent: Prof. Dr. med. F. Scheiffarth
Korreferent: Prof. Dr. med. V. Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 7. 1972

Sonderdrucke aus

Allergie und Immunologie

Organ der Gesellschaft für Allergie- und Immunitätsforschung der Deutschen Demokratischen Republik

JOHANN AMBROSIUS BARTH LEIPZIG

Band 17 (1971) **Heft 2**

Aus der Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg (Vorst.: Prof. Dr. F. SCHEIFFARTH)

Durch Immunsuppressiva gesteigerte zelluläre Antikörpersynthese

Von F. SCHEIFFARTH, H. W. BAENKLER und W. FLIERL[1]

[1] D 29.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Unter bestimmten Bedingungen kann die Immunantwort durch immunsuppressive Maßnahmen gesteigert werden. Das läßt sich sowohl mit chemischen Substanzen [1] als auch mit Röntgenstrahlen demonstrieren [2]. Dieses Phänomen tritt sogar dann auf, wenn die immunsuppressive Wirkung lediglich einen Teil des gesamten Wirkungsspektrums darstellt [6]. Als Ursache hierfür wurde eine Ausschwemmung in die Peripherie oder ein Proliferationsreiz durch freiwerdende Zellfragmente angenommen. Neuere Untersuchungen zeigten, daß auch über eine Beeinflussung des immunologischen Rückkoppelungsmechanismus die 19 S-Immunglobulinproduktion unter Immunsuppression länger anhält [7]. Auch in der Klinik beobachtet man nach Einleitung einer immunsuppressiven Behandlung häufig einen vorübergehenden Anstieg der weißen Blutzellen und Thrombozyten. Dieses Phänomen wurde allerdings noch nicht untersucht.
Um diesbezüglich weitere Einzelheiten zu erfahren, wurde die durch Immunsuppression erreichbare Stimulierung des immunologischen Systems am Modell der Parabiose studiert, wobei zum Nachweis der Antikörper-bildenden Zellen die lokale Hämolyse in Gel (LHG) herangezogen wurde (Plaque-Technik).

Material und Methoden

Als Versuchstiere wurden weibliche Mäuse des Stammes NMRI verwendet. Ihr Alter betrug mindestens 4 Monate, das Gewicht im Schnitt 25 g.

Parabiose: Die Anästhesie erfolgte mit Pentobarbital. Nach Entfernung der Haare und Desinfektion wurde das Abdomen lateral in einer Länge von etwa 2 cm eröffnet. Die Vereinigung der Partner erfolgte in einer hier nicht näher zu beschreibenden Technik, die bei möglichst geringer mechanischer Belastung die Durchgängigkeit der Anastomose gewährleistete. Die Tiere wurden für die Dauer des Versuchs mit einem Gipsverband fixiert. Einige wurden für 30 Tage in Parabiose belassen, um die Leistungsfähigkeit der angewandten Technik zu demonstrieren. Zu Versuchsende wurde die Durchgängigkeit durch i. p. Injektion von Methylenblau geprüft.

Immunsuppressive Behandlung: Einer der Parabionten (Tier A) erhielt kurzzeitig ein immunsuppressives Mittel. Der einen Gruppe wurde 3mal 1 mg Cyclophosphamid (Cph), eine alkylierende Substanz, der anderen 3mal 0,6 mg Azathioprin (Ath), ein Antimetabolit, i. p. verabreicht. Die Tiere der Serie I wurden einen Tag nach der letzten Einzeldosis mit dem Partner parabiontisch vereinigt (Frühparabiose), die Tiere der Serie II nach einem Zwischenraum von 10 Tagen (Spätparabiose).

Nachweis Antikörper-bildender Zellen: Der andere Parabiont (Tier B) wurde mit 400 Millionen Hammelerythrozyten (HE), i. p. verabreicht, sensibilisiert. Tier B wurde stets einen Tag nach der Sensibilisierung mit Tier A in Parabiose vereinigt. Nach weiteren 6 Tagen wurden die Tiere getötet und die Milz entnommen. Aus dem von Fett und Bindegewebe befreiten Organ wurde die Zellsuspension für die weitere Verarbeitung gewonnen. Die LHG wurde in üblicher Weise [3, 4, 5] durchgeführt und die Anzahl direkt Plaque-bildender (DPMZ)

und indirekt Plaque-bildender (IPMZ) Zellen pro Million Milzzellen bestimmt. Die Milzen der einzelnen Tiere wurden stets getrennt untersucht. Auch bei den nicht-sensibilisierten Tieren A wurde die LHG durchgeführt. Als Kontrolle wurden sensibilisierte Tiere (B_K) mit unbehandelten Tieren (A_K) in Parabiose gehalten. Sensibilisierung und Parabiose erfolgten nach dem gleichen Schema wie im Hauptversuch. (Es muß betont werden, daß zur Sensibilisierung jeweils dieselbe HE-Suspension im Haupt- und Kontrollversuch Verwendung fand.)
Die Einzelwerte wurden aus je 4 Ansätzen ermittelt. Die statistische Überprüfung erfolgte mit dem T-Test, nachdem dessen Berechtigung durch den Nachweis einer normal verteilten Population mit dem KOLMOGOROFF-SMIRNOW-Test bewiesen war[1].

Ergebnisse

Die Parabionten ließen keine Veränderung in ihrem Verhalten erkennen. Ihr Gewicht blieb praktisch unverändert. Bei Eröffnung der Leibeshöhle fanden sich keine pathologischen Veränderungen. Ein Teil der Tiere B und B_K hatte eine leicht vergrößerte Milz. Die Anastomose war in allen Fällen durchgängig.
Die Tiere B_K entwickelten 7 Tage nach der Sensibilisierung in der Regel mehr als 100 PMZ pro Million Milzzellen. Typischerweise lagen zu diesem Zeitpunkt die DPMZ und IPMZ in der gleichen Größenordnung mit einem leichten Überwiegen der IPMZ. In der Milz der Tiere A_K konnten PMZ nur vereinzelt nachgewiesen werden. Doch wurde bei einem Großteil der Tiere der unspezifische Hintergrund (background) überschritten.
Im Vergleich dazu zeigten die Tiere B der Serie I einen gesteigerten Gehalt der Milz an PMZ. Der Steigerungsfaktor gegenüber den Kontrollen (B/B_K) war sowohl in Hinsicht auf die DPMZ und IPMZ als auch auf die mit Cph und Ath behandelten Gruppen hochsignifikant ($P < 0{,}001$). Auch die Tiere A zeigten einen über den background erhöhten Milzgehalt an PMZ (Tab. 1 und 2).

Tabelle 1. PMZ pro Million Milzzellen getrennt untersuchter Tiere bei Frühparabiose nach Behandlung mit Zyklophosphamid (Mittelwert aus je 4 Ansätzen)

B	196	133	145	205	291	229	271	196	
B_K	108	88	76	94	48	36	27	45	
B/B_K	1,81	1,51	1,90	2,18	6,06	6,36	10,03	6,57	DPMZ
A	6	5	4	7	1	1	1	1	
A_K	2	5	3	1	2	1	4	5	
B	165	188	176	226	328	340	284	303	
B_K	85	58	43	48	85	135	98	112	
B/B_K	1,94	3,24	4,09	4,70	3,85	2,51	2,89	2,70	IPMZ
A	1	0	0	3	1	12	15	14	
A_K	3	2	4	6	0	0	0	0	

Hauptversuch: A = behandelt, nicht sensibilisiert; B = sensibilisiert.

Kontrolle: A_K = nicht behandelt, nicht sensibilisiert; B_K = sensibilisiert.

Im Gegensatz dazu ist der Gehalt an PMZ bei den Tieren der Serie II gegenüber B_K nicht erhöht. Dies gilt wiederum für die mit Cph oder Ath behandelten Gruppen in gleicher Weise. Anders ist es bei Betrachtung der 19 S- und 7 S-Immunglobulin-Produzenten. Während sich bei den DPMZ ein signifikanter Unterschied zwischen Haupt- und Kontrollversuch nicht nachweisen läßt

[1] Für die Ausführung der Rechenarbeiten danken wir Herrn Dipl. Phys. R. NEUWIRTH, Medizinische Universitätsklinik.

($0,40 > p > 0,30$ bzw. $0,30 > p > 0,20$) sind die IPMZ signifikant erniedrigt (jeweils $p < 0,01$). Auch bei der Serie II lagen die ermittelten Werte der Tiere A mehrfach über dem background (Tab. 3 und 4).

Tabelle 2. PMZ pro Million Milzzellen getrennt untersuchter Tiere bei Frühparabiose nach Behandlung mit Azathiopren (Mittelwerte aus je 4 Ansätzen)

B	334	334	395	303	323	338	343	287	
B_K	103	83	158	117	171	120	151	139	
B/B_K	3,24	4,02	2,50	2,58	1,88	2,81	2,27	2,06	DPMZ
A	10	4	7	5	2	1	1	2	
A_K	3	7	10	9	4	6	10	12	
B	415	517	440	454	496	484	511	582	
B_K	129	135	111	175	218	236	183	251	
B/B_K	3,21	3,82	3,96	2,59	2,27	2,05	2,79	2,31	IPMZ
A	0	1	3	4	0	0	0	2	
A_K	4	4	10	6	4	3	0	6	

Hauptversuch: A = behandelt, nicht sensibilisiert; B = sensibilisiert.
Kontrolle: A_K = nicht behandelt, nicht sensibilisiert; B_K = sensibilisiert.

Tabelle 3. PMZ pro Million Milzzellen getrennt untersuchter Tiere bei Spätparabiose nach Behandlung mit Zyklophosphamid (Mittelwerte aus je 4 Ansätzen)

B	137	103	69	99	207	208	188	196	
B_K	139	103	130	124	233	207	241	257	
B/B_K	0,98	1,00	0,53	0,79	0,88	1,00	0,78	0,76	DPMZ
A	1	1	1	1	1	1	2	1	
A_K	1	1	1	0	2	2	3	2	
B	215	169	160	216	210	193	181	183	
B_K	238	261	222	227	269	311	295	306	
B/B_K	0,90	0,64	0,72	0,95	0,74	0,44	0,61	0,59	IPMZ
A	1	1	0	1	0	0	0	1	
A_K	2	6	2	2	0	1	0	0	

Hauptversuch: A = behandelt, nicht sensibilisiert; B = sensibilisiert.
Kontrolle: A_K = nicht behandelt, nicht sensibilisiert; B_K = sensibilisiert.

Tabelle 4. PMZ pro Million Milzzellen getrennt untersuchter Tiere bei Spätparabiose nach Behandlung mit Azathiopren (Mittelwerte aus je 4 Ansätzen)

B	167	156	159	161	156	157	153	162	
B_K	151	149	165	173	139	150	116	162	
B_K	151	149	165	173	139	150	116	162	
B/B_K	1,10	1,04	0,96	0,93	1,12	1,04	1,31	1,00	DPMZ
A	0	0	2	1	0	1	2	1	
A_K	0	1	1	0	0	0	1	1	
B	203	230	235	217	204	222	210	213	
B_K	184	209	187	214	208	201	197	189	
B/B_K	1,10	1,10	1,25	1,01	0,98	1,10	1,06	1,12	IPMZ
A	0	0	1	2	0	1	0	0	
A_K	1	0	0	1	0	1	0	0	

Hauptversuch: A = behandelt, nicht sensibilisiert; B = sensibilisiert.
Kontrolle: A_K = nicht behandelt, nicht sensibilisiert; B_K = sensibilisiert.

Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Steigerung der Anzahl Plaque-bildender Zellen in der Milz eines sensibilisierten Tieres dann nachgewiesen werden, wenn bei dem in Parabiose vereinigten Partner eine kurzzeitig durchgeführte immunsuppressive Behandlung unmittelbar vorangegangen war. Dies trifft sowohl für die 19 S-Immunglobulinproduzenten und 7 S-Immunglobulinproduzenten als auch für Cph und Ath behandelte Tiere zu.

Dieser Effekt war jedoch dann nicht mehr gegeben, wenn zwischen der letzten Einzeldosis des Immunsuppressivum und der Parabiose ein Intervall von 10 Tagen bestand. In dieser Serie ist der Gehalt an PMZ gegenüber den Kontrollen nicht vermehrt. Während die DPMZ des Haupt- und des Kontrollversuchs sich nicht unterscheiden, liegt eine signifikante Erniedrigung der IPMZ vor.

Der Steigerungseffekt ist offensichtlich durch einen Faktor ausgelöst worden, der vom behandelten auf das unbehandelte Tier übergetreten ist. Die Passage ist über die Verbindung des Abdomens beider Partner oder über eine Kommunikation des Gefäßsystems denkbar. Da in allen Fällen die Anastomose der Bauchhöhle ihre Durchgängigkeit bewahrt hatte, eine Verbindung des Gefäßapparats beider Partner jedoch nicht erkennbar war, ist der Austausch des Steigerungsfaktors über die Anastomose wahrscheinlich.

Die Deutung, daß es sich um ein Ausschüttungsphänomen im Sinne eines plötzlichen Abgebens von Antikörpern an das Blut handelt, kann nicht zutreffen, da in diesem Fall die PMZ nicht hätten vermehrt gefunden werden können. Die Annahme einer verlängerten 19 S-Immunglobulinproduktionsphase auf Grund einer Beeinflussung des Regelkreises der Antikörperproduktion würde durchaus mit der erhöhten Anzahl der nachgewiesenen DPMZ übereinstimmen. Doch muß diese Annahme verworfen werden, da auch die IPMZ als 7 S-Immunglobulinbildner vermehrt waren. Eine unspezifische, etwa operationsbedingte Reizerscheinung als Interpretation ist deshalb unzureichend, weil die Kontrolltiere abweichende Werte erbrachten und außerdem die Ergebnisse dann anders ausfielen, wenn die Behandlung längere Zeit vor der Parabiose abgeschlossen war.

Demnach muß die Natur des Steigerungsfaktors ein lösliches Protein oder ein Zellfragment sein. Dies macht alle Befunde verständlich, denn dadurch wird auch die relative Kurzlebigkeit des postulierten Faktors erklärt, der entweder ausgeschieden oder durch Ab- bzw. Umbau inaktiviert wird. Daß es sich um intakte Zellen handelt, ist unwahrscheinlich, da in diesem Fall ein längerer Nachweis gelingen müßte. Die Unterschiede der DPMZ und IPMZ der Serie II lassen sich auf Grund der vorliegenden Versuchsanordnung nicht erklären.

Die Tatsache, daß auch in nicht-sensibilisierten Tieren PMZ auftreten, kann mehrere Ursachen haben. Einmal ist es denkbar, daß einzelne Antikörperbildende Zellen des sensibilisierten Tieres in das nicht-sensibilisierte übergetreten sind und so in der Milz nachgewiesen wurden. Zum anderen können einige der injizierten HE die Anastomose passiert haben und eine, allerdings geringfügige, Immunantwort auslösen. Dies wäre sogar dann möglich, wenn es sich lediglich um Bruchstücke (z. B. Membranen) handelte, sofern deren Antigenität gewahrt blieb. Welche Vorstellung zutrifft, kann nicht entschieden werden.

Zusammenfassung: Mit HE sensibilisierte Mäuse des Stammes NMRI wurden einen Tag nach der Sensibilisierung mit Partnern in Parabiose gehalten, nachdem diese kurzzeitig immunsuppressiv vorbehandelt worden waren. Sofern die letzte Einzeldosis einen Tag vor Beginn der Parabiose verabreicht worden war, ließ sich eine Steigerung der zellulären Antikörpersynthese in den sensibilisierten Tieren nachweisen. Dieser Steigerungseffekt ging dann verloren, wenn

die Parabiose erst 10 Tage nach der letzten Einzeldosis begann. Die Natur des Faktors ist noch unbekannt. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Protein oder Zellfragment, das über die Anastomose von dem behandelten in das sensibilisierte Tier übergetreten ist.

Summary: Mice of the NMRI strain, which were sensitized with HE, were, one day after sensitization, kept in parabiosis with partners subsequent to their having been pretreated immunosuppressively for a short time. In those cases in which the last single dose had been administered one day before the commencement of parabiosis it was possible to demonstrate an increase in cellular antibody synthesis to be demonstrated in the sensitized animals. This effect of increase was lost in those cases where parabiosis was not commenced until 10 days after administering the last single dose. The nature of this particular factor is still unknown. It is quite probable that a protein or cell fragment is involved in the process, which is transferred, via anastomosis, from the treated to the sensitized animal.

Literatur: 1. Chanmougan, D., und R. S. Schwartz, J. exp. Med. **124** (1966) 363. – 2. Dixon, F. J., und P. J. Mc. Cohaney, J. exp. Med. **117** (1963) 833. – 3. Dresser, D. W., und H. H. Wortis, Nature (Lond.) **208** (1965) 859. – 4. Ingraham, J. S., und A. Bussard, J. exp. Med. **119** (1964) 667. – 5. Jerne, N. K., und A. A. Nordin, Science **140** (1963) 405. – 6. Scheiffarth, F., H. W. Baenkler und S. Pfister, Int. Arch. Allergy **40** (1971) 117. – 7. Uhr, J. W., und G. Möller, Advanc. Immun. 8 (1968) 81.

Bei der Schriftleitung eingegangen am 10. 10. 1970.

Anschrift der Verfasser: Prof. Dr. F. Scheiffarth, Dr. H. W. Baenkler und W. Flierl,
Abteilung für Immunologie des Universitäts-Krankenhauses,
BRD-852 Erlangen, Krankenhausstr. 12

ALLERGIE UND IMMUNOLOGIE
Jährlich erscheint ein Band mit 4 Heften. Bezugspreis pro Band 44,—, zuzüglich Postgebühren

Günther, Kirstein & Wendler, 7027 Leipzig, Schönbachstraße 50 (III/18/149). ZLN 1381

L E B E N S L A U F

Am 26. 8. 1944 wurde ich, Hans Wolfgang August Flierl, als erstes Kind des damals in Rußland vermußten Oberstleutnants i.G. Hans Flierl und seiner Ehefrau Friedel Flierl, geb. Nißl, in Garmisch-Partenkirchen geboren.

Von 1950 - 1954 besuchte ich die Volksschule in München-Gräfelfing und trat dann in das dortige Realgymnasium ein, an dem ich 1964 das Abitur bestand.

Danach meldete ich mich freiwillig für zwei Jahre Dienstzeit zur Bundeswehr in die Gebirgsdivision. 1966 wurde ich als Leutnant der Reserve entlassen.

Im Wintersemester desselben Jahres begann ich mein Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Am 5. 3. 1969 bestand ich die ärztliche Vorprüfung und am 28. 7. 1972 das medizinische Staatsexamen.